



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0755/94

(51) Int.Cl.6

G 01 N 33/12

(22) Indleveringsdag: 24 jun 1994

G 01 N 33/03

(41) Alm. tilgængelig: 25 dec 1995

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 28 maj 1996

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(73) Patenthaver: *Slagteriernes Forskningsinstitut; Møgløgaardsvej 2; DK-4000 Roskilde, DK

(72) Opfinder: Jens *Hansen-Møller; DK, Christian *Friis; DK, Camilla *Ærtebjerg *Bæk; DK, Steen Honoré *Hansen; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) Fremgangsmåde til at undersøge grise for at bestemme om de er egnede til avl eller formering samt anvendelse af dyr eller sæd

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

755 - 94

En fremgangsmåde til at undersøge grise for at bestemme om de er egnede til avl eller formering, ved hvilken en prøve fra et dyr analyseres, og dyret på grundlag af analysens resultat henføres til en kategori af egnede dyr eller en kategori af uegnede dyr.

Grisene undersøges for en arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af dyrets kød- eller fedtvæv, idet man bestemmer tilstedeværelse eller fravær i prøven af

- en metabolit af stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt af dyrets kød- eller fedtvæv,
- et naturligt enzym, der kan metabolisere stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt, eller
- en DNA-sekvens, som koder for produktionen af pågældende enzym.

Prøven undersøges fortrinsvis for en metabolit af indol eller skatol.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til at undersøge grise for at bestemme om de er egnede til avl eller formering, ved hvilken fremgangsmåde en prøve fra et dyr analyseres, og dyret på grundlag af analysens resultat henføres til en kategori af egnede dyr eller en kategori af uegnede dyr.

- 5 Ved den danske svineproduktion anvendes traditionelt hangrise, der er kastreret, for at undgå lugtproblemerne, der kan være ved kød fra ukastrerede grise. Dette kød kan ved tilberedningen hos forbrugeren udvikle en ubehagelig lugt, den såkaldte omelugt. Det er ganske vist kun ca. 5 % af de ukastrerede hangrise, der har denne uheldige egenskab, men da det ikke uden videre kan forudsiges, hvilke grise, der vil give kød
10 med ubehagelig lugt, må svineproducenterne af forbrugerhensyn kastrere alle hangrise.

Den ubehagelige lugt, der kan være ved kød fra ukastrerede hangrise, hidrører især fra frigørelsen af skatol, men kan også stamme fra androstenon, der især forekommer hos ældre dyr.

- Indholdet af skatol i kød fra ukastrerede hangrise afhænger af forskellige faktorer og
15 varierer inden for vide grænser. Overskrides en grænse på 0,20–0,25 ppm. skatol i spækket anses det normalt for uegnet til tilberedning hos forbrugeren. Ligger indholdet under denne grænse vil forbrugeren ikke mærke nogen lugtgener.

- Der er foretaget omfattende undersøgelser for at finde årsagen til, at nogle hangrise har et højere skatolindhold i kødet end andre. Det er fundet, at foderets sammensætning
20 spiller en væsentlig rolle, men også andre faktorer er afgørende, f. eks. tarmens bestand af bakterier, årstiden og staldforholdene, se f. eks. "Measurement and prevention of Boar Taint i Entire Male Pigs", INRA Editions, Paris 1993, editor M. Bonneau (Proceedings of a meeting of the E.A.A.P working group in Roskilde, Denmark, 12.–14. oktober, 1992). Det er også blevet foreslået, at genetiske forhold
25 skulle have betydning for skatoldeponeringen i spæk, især i særlige miljøer, men denne hypotese er ikke blevet bekræftet, se K. Lundstrøm og B. Malmfors: "Genetic influence on skatole disposition in entire male pigs", ibid. 159–165.

Ved de hidtil foretagne undersøgelser er fundet et meget sammensat billede af årsagsforholdene, og man har ikke kunnet pege på nogen enkelt faktor som hovedansvarlig for forekomsten af skatol hos hangrise, hvis kød er uegnet til tilberedning hos forbrugeren.

- 5 I de seneste år er der i Danmark udviklet og indført en spektrofotometrisk analysemetode til bestemmelse af skatolindholdet i svineslagtekroppe af ukastrerede hangrise, se f. eks. dansk patent nr. 155.200 (EP-B-0 088 103). Ved hjælp af denne metode er det muligt at frasortere kroppe, hvis kød vil udvikle ubehagelig lugt ved tilberedningen. Det bliver således muligt at undgå den i Danmark traditionelt anvendte
- 10 kastrering af de unge hangrise. Metoden er imidlertid omkostnings- og pladskrævede. Det er desuden blevet foreslået at bestemme skatolindholdet ved immunologisk analyse, se f. eks. dansk patentansøgning nr. 4221/89 (EP-A-0 368 942), men metoden har ikke vundet indpas.

- Sideløbende med udviklingen og indførelsen af den ovennævnte spektrofotometriske
- 15 metode på de danske slagterier er der arbejdet med at finde årsagsforholdene til den ubehagelige lugt, men hidtil har det ikke i væsentligt omfang været muligt at begrænse antallet af dyr med ubehagelig lugt. Forskellige forholdsregler vedrørende fodringen og staldforholdene er blevet foreslået, uden at det i væsentlig grad formindsker problemet. Et relativt højt antal af frasorterede slagtekroppe udgør stadig en betragtelig
- 20 meromkostning ved produktionen af kød fra ukastrerede hangrise, idet kødet fra de frasorterede, lugtende slagtekroppe ikke bruges til fersk konsum, men må forarbejdes på slagteriet til produkter, der ikke skal opvarmes hos forbrugeren.

- Formålet med opfindelsen er at reducere problemerne i forbindelse med lugtende kød fra ukastrerede hangrise på en væsentligt mere markant måde end det hidtil er
- 25 lykkedes ved forskellige forholdsregler.

Ifølge opfindelsen har det overraskende vist sig, at hovedårsagen til, at der forekommer lugtende hangrise er, at disse dyr har en arvelig defekt, der giver sig

udtryk i deres metabolitter af skatol, og at forekomsten af lugtende dyr i en bestand kan reduceres eller elimineres på kortere eller længere sigt ved, at der i avlen eller formeringen kun anvendes dyr, der ikke lider af denne defekt. Nærmere bestemt er forklaringen på skatolproblemet hos ukastrede hangrise, at de lugtende dyr lider af
5 en (arvelig) metabolisk defekt, der bevirker, at de ikke er i stand til at udskille skatol i fornødent omfang, at det ved kendskab til forskellen i metabolismemønstret hos normale og lugtende dyr er muligt ved f. eks. analyse af en plasma- eller urinprøve at afsløre, om et dyr vil blive et problemdyr, og at dette anvendes i avlsarbejdet.

Det er ved forsøg blevet bekræftet, at den arvelige defekt er af overordentlig stor
10 betydning for skatolindholdet og desuden giver sig udtryk i metabolitter, hvis niveau og art er tydeligt anderledes end i normale dyr. I modsætning til hvad der hidtil har været antaget af fagfolk inden for området, kan de lugtende dyr således klart adskilles fra de normale dyr.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er derfor kendetegnet ved, at grisene undersøges
15 for en arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af dyrets kød- eller fedtvæv, hvorved bestemmes på iøvrigt kendt måde tilstedeværelse eller fravær i prøven af

- en metabolit af stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt af dyrets kød- eller fedtvæv,
- et naturligt enzym, der kan metabolisere stoffet, der er ansvarligt for den
20 ubehagelige lugt, eller
- en DNA-sekvens, som koder for produktionen af pågældende enzym.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen repræsenterer en tydelig forbedring i forhold til den hidtil anvendte analyseteknik, hvor man må undersøge hver eneste slagtekrop af de ukastrede hangrise, og hvor grænsen mellem lugtende og ikke lugtende dyr
25 desuden påvirkes af forskellige faktorer, såsom staldmiljø, foder, transport og behandling på slagtedagen. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen konstateres det ikke alene på entydig måde, om det undersøgte dyr hører til den lugtende kategori,

men undersøgelsens resultat kan også overføres til efterkommerne af det undersøgte dyr, således at kun de gode dyr anvendes til avl eller formering. På grundlag af tidligere udførte analyser af skatolindholdet i plasmaprøver fra forskellige individer af ukastrede hangrise kunne det ikke forudses, at det er muligt at opnå en så væsentlig
 5 forbedring af produktionen af ukastrede hangrise.

Stoffer, der er ansvarlige for den ubehagelige lugt fra grises kød- eller fedtvæv, og hvis metabolitter søges påvist ifølge den omhandlede fremgangsmåde, er f. eks. indol, skatol (3-methyl-indol) eller andre indolderivater, androstenoner eller andre feromoner.

- 10 En prøve fra et dyr analyseres for et eller flere af stofferne ved i og for sig kendte analysemetoder, f. eks. HPLC, GC, TLC, spektrofotometri, fluorimetri, immunologisk analyse, elektroforese eller "blotting"-analyse. Fortrinsvis anvendes HPLC.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen analyserede prøve kan være urin, plasma, spyt eller lever-, kød- eller fedtvæv, eller deres koncentrater eller ekstrakter. Ved
 15 plasma skal overalt forstås blodplasma.

Ved grise skal der i foreliggende sammenhæng navnlig forstås orner og ukastrede hangrise, idet lugtproblemerne er størst ved disse dyr. Ved grise skal der imidlertid også forstås søer og kastrede hangrise, idet de undertiden også kan udvikle en ubehagelig lugt som den, der kendes fra orner eller ukastrede hangrise.

- 20 Ved en DNA-sekvens skal i det foreliggende også forstås de deraf afledte sekvenser før eller efter opformering, f. eks. mRNA og tRNA.

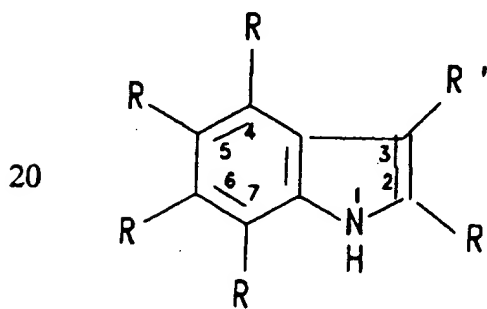
Fravær af metabolit, enzym eller DNA-sekvens betyder, at den undersøgte gris har en arvelig defekt med hensyn til metabolismen af stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt. Tilstedeværelse af visse metabolitter, der ikke forekommer i normale
 25 grise, kan imidlertid også være en indikator for, at grisen har en sådan arvelig defekt.

Det drejer sig da om metabolitter, der dannes som kompensation for den arvelige defekt.

I foreliggende sammenhæng betyder ordet "fravær", at de søgte substanser (metabolit, enzym eller DNA-sekvens) ikke kan findes ved den anvendte analysemetode eller findes i en lille mængde, f. eks. ved de lugtende dyr i en væsentlig mindre mængde end i en gennemsnitlig bestand af dyr eller en bestand af normale dyr, f. eks. kun i den halve mængde. Ordet "tilstedeværelse" betyder i foreliggende sammenhæng, at de søgte substanser findes i en større mængde. I forbindelse med en kompenserende metabolisme i lugtende dyr findes metabolitten, der dannes som følge af denne omsætning, f. eks. i en mængde, der ligger væsentlig over det, der er i en gennemsnitlig bestand af dyr eller en bestand af normale dyr, f. eks. i den dobbelte mængde.

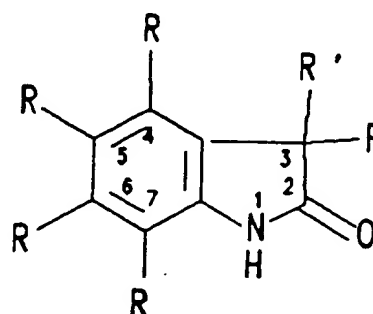
En foretrukket udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at prøven undersøges for en metabolit af indol eller skatol. Skatol er hovedansvarlig for den ubehagelige lugt, i det mindste i den danske svineproduktion.

Der er fundet en tydelig sammenhæng mellem lugtende grise og tilstedeværelse eller fravær af bestemte metabolitter af skatol og skatollignende forbindelser. I overensstemmelse med dette består en udførelsesform i, at prøven analyseres for en metabolit valgt blandt forbindelserne med formlerne



Ia

og



Ib

hvor grupperne R uafhængigt af hinanden er H eller OH, og gruppen R' betyder CH_3 , CH_2OH , CHO eller COOH , idet mindst én af grupperne R er OH, når R' betyder CH_3 , og deres ethere med glucuronsyre, sulfatrestere, N-oxider og N-glucuronider.

- Særlig tydelig sammenhæng og klare analyseresultater opnås, når prøven analyseres
 5 for en forbindelse med formelen Ia eller Ib med en 4-, 5-, 6- eller 7-stillet OH-gruppe.

Fortrinsvis analyseres prøven for 6-hydroxyskatol.

- Den substansmængde, der skal være til stede for at indikere, om den undersøgte gris har en arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt, afhænger af analysemetoden og
 10 den søgte substans. Når der er tale om den sædvanlige metabolisme, foretrækkes det, at den søgte metabolit findes i en mængde, der ligger mindst 2 gange, især mindst 3 gange under gennemsnittet hos en tilfældigt sammensat, større population af grise, før et dyr kategoriseres som et individ med arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt.

- Når der er tale om en kompensationsmetabolisme til den normale metabolisme af
 15 stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt, analyseres prøven for en sådan metabolit, og det foretrækkes, at den søgte metabolit findes i en mængde, der ligger mindst 2 gange, især mindst 3 gange over gennemsnittet hos en tilfældigt sammensat, større population af grise, før et dyr kategoriseres som et individ med arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt.

- 20 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan en prøve analyseres for flere metabolitter, herunder f. eks. metabolitter fra en kompensationsmetabolisme, hvorefter analyseresultaterne kan indsættes i en algoritme for undersøgelse af tilstedeværelse eller fravær af arvelig defekt. Herved kan eventuelt opfanges fejl i analysen eller detektionen. Metoden kan også bruges til på én gang at detektere flere defekter, f. eks.
 25 vedrørende metabolismerne af forskellige, ubehageligt lugtende stoffer, såsom skatol og androstenon.

For at forbedre detektionssikkerheden og undgå at være afhængig af den naturlige forekomst af det ubehageligt lugtende stof, som kan variere med bl.a. fodersammensætning og årstid, kan der i grisene inden udtagningen af prøven injiceres en dosis af stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt. Den anvendte dosis kan være af en sådanne størrelse, at grisens naturlige indhold kun kommer til at udgøre en mindre del. Omsætningen af dosen i grisen kan følges ved at udtage prøver med fastsatte tidsintervaller og analysere for indholdet af metabolitter.

For at kunne skelne stoffet, der er indgivet kunstigt, fra stoffet, der forekommer naturligt, og for derved at kunne eliminere sidstnævntes indflydelse på analyseresultatet, foretrækkes det, at det indgivne stof er mærket, fortrinsvis med de radioaktive isotoper ^{14}C , ^{13}C , ^3H eller ^2H , som er indsat et eller flere steder i stoffets molekyle i stedet for det tilsvarende almindelige grundstofatom, eller at det indgivne stof foreligger i form af en ikke naturligt i grise forekommende skatol analog, fortrinsvis tropisetron eller ondansetron.

Metabolitterne kan bestemmes ved målemetoder som HPLC, GC, ELISA, TLC og spektrofotometri. Som matrice anvendes fortrinsvis en prøve af plasma, urin eller spyt. En fordel ved at bestemme tilstedeværelse eller fravær af en metabolit/metabolitter er, at metoden er forholdsvis simpel at etablere.

Den fundne tydelige sammenhæng mellem lugtende grise og oxygenholdige metabolitter af skatol betyder, at defekten kan findes i cytochrom P_{450} -systemet, f. eks. i et manglende isoenzym. Ved en særlig udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen analyseres prøven derfor for et P_{450} -isoenzymsystem eller en DNA-sekvens, som koder for produktionen af dette isoenzym.

Cytochrome P_{450} -isoenzymer er en stor familie af enzymer, der betegnes som terminale oxidoreduktaser, dvs. det er enzymer, der er i stand til at katalysere indbygningen af et oxygenatom i et organisk molekyle, f. eks. skatol. De forskellige mere eller mindre ens enzymer betegnes isoenzymer og kan opdeles i 25 familier, der igen kan opdeles

i underfamilier. Det er karakteristisk for et isoenzym, at det oxygenatom, det kan indføre i et organisk molekyle, oftest indføres et bestemt sted, f. eks. som en 7α -hydroxy-gruppe i testosteron. Der ses dog ofte et betydeligt overlap mellem isoenzymernes specificitet. For mange af isoenzymerne findes substrater, der kan anvendes til test af deres tilstedeværelse og/eller aktivitet. For flere af isoenzymerne kendes eksempler på, at de udtrykkes afhængigt af den tilstedeværende mængde af forskellige hormoner, såsom vækst- eller kønshormoner, og det betyder, at dyrets alder kan have betydning for, hvor tydeligt defekten udtrykkes.

Efter at isoenzymet, der er ansvarlig for defekten, er identificeret, kan denne viden derefter danne grundlag for udvikling af en DNA-baseret testprocedure. Den anses at have væsentlige fordele ved at være billig og hurtig.

I forbindelse med et for defekten ansvarligt cytochrom P_{450} -isoenzym kan udvikles en test for tilstedeværelse eller fravær af dette isoenzym eller den tilsvarende genetiske kode. Fortrinsvis anvendes en af følgende metoder:

- 15 1) Mængden af det eller de interessante isoenzymer bestemmes på f. eks. en blod- eller leverbiopsiprøve. Som målemetode anvendes f. eks. ELISA, SDS-PAGE, Northern eller Western blotting eller evt. HPLC eller CZE. En fordel ved en sådan procedure er, at den er simpel, og at resultaterne er sikre.
- 20 2) Der fremskaffes et testsubstrat, der kan afgøre, om det aktuelle isoenzym er til stede i f. eks. en blod- eller leverbiopsiprøve. Som målemetode anvendes f. eks. ELISA, HPLC, CZE, GC eller spektrofotometri. En fordel ved en sådan procedure er, at den er simpel, og at resultaterne er sikre.
- 25 3) Det undersøges, om den genetiske kode for det eller de interessante isoenzymer er til stede i f. eks. en blod- eller leverbiopsiprøve, evt. efter forstærkning ved hjælp af PCR. Som målemetode anvendes f. eks. ELISA, SDS-

PAGE, Northern eller Western blotting eller evt. HPLC eller CZE. En fordel af at ved en sådan procedure er, at den er hurtig og billig.

Et enzym, der har vist sammenhæng med den omhandlede defekt, er $P_{450}IID6$. Fortrinsvis analyseres prøven derfor for enzymet $P_{450}IID6$ eller en DNA-sekvens, som

5 koder for produktionen af dette enzym.

Opfindelsen angår også anvendelse af mindst ét forælderdyr, som er fundet fri for arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af dets kød- eller fedtvæv ved fremgangsmåden ifølge krav 1, eller som nedstammer fra et eller flere sådanne dyr, ved avl eller formering af grise.

10 Desuden angår opfindelsen anvendelse af sæd fra orner, som er fundet fri for arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af deres kød- eller fedtvæv ved fremgangsmåden ifølge krav 1, eller orner, som nedstammer fra et eller flere sådanne dyr, til inseminering af søer.

Opfindelsen illustreres af de følgende eksempler, hvori

- 15
- fig. 1 og 2 viser chromatogrammer af urinprøver,
 - fig. 3 og 4 scintillationstællingsdiagrammer af delvis rensede fraktioner og
 - fig. 5 og 6 chromatogrammer af rensede fraktioner med metabolit MII.

Eksempel 1

I en ukastreret hangris med normalt skatolindhold og i en ukastreret hangris med

20 forhøjet skatolindhold injiceres 5 mg/kg radioaktivt mærket skatol. Fra grisene opsamles urinfraktioner over forud bestemt tidsintervaller. Prøver fra urinfraktionerne analyseres chromatografisk ved hjælp af en kendt HPLC-analysemetode, jvf. Jens Hansen-Møller: "Determination of indolic compounds in pig back fat by solid phase extraction and gradient high-performance liquid chromatography with special emphasis

on the boar taint compound skatole, Journal of Chromatography, 624 (1992) 479–490.

I fig. 1 og 2 er vist et chromatogram af en urinprøve opsamlet fra henholdsvis en normal gris og fra en lugtende gris.

Det ses af chromatogrammerne, at metabolitten MII findes i den normale gris, men helt savnes i den unormale gris, der har forhøjet skatolindhold. I den unormale gris findes metabolitten MIII derimod i højere mængde end i den normale gris. Forsøget viser derfor, at den unormale gris har en afvigende metabolisme, der giver sig udtryk i et overraskende anderledes metabolitmønster.

Eksempel 2

10

Dette eksempel omhandler isolering og identificering af en skatol-metabolit fra en ukastreret hangris med normalt skatolindhold.

Opsamling af fraktioner med metabolitter af skatol:

I grisen injiceres intravenøst 5 mg/kg radioaktivt mærket skatol. Urinfraktioner opsamles derefter fra grisen. Urinfraktionen, der opsamles 6 til 8 timer efter indgivelsen af det radioaktivt mærkede skatol, har størst radioaktivitet. Der bruges 1150 ml af denne urinfraktion, som filtreres gennem et papirfilter, tilsættes 0,05 % natriumazid og afgasses på ultralydbad. pH måles til 7,8.

1. rensning:

20 Til fraktionering af urinen anvendes en 100 cm lang glaskolonne med 2,5 cm indre diameter. Kolonnematerialet er Amberlite XAD-2 (polystyrenmatrix) med en partikelstørrelse på 0,3 til 1 mm. Søjlen stilles i kølerum for at gøre de radioaktive metabolitter mere stabile og hæmme bakterievækst i søjlen.

Søjlen skylles først med methanol ved et flow på 3,0 ml/min. Søjlen skylles derefter med ca. 800 ml 0,01 M kaliumphosphatbuffer med pH 7,5. Til bufferopløsningen er sat 0,05 % natriumazid som konserveringsmiddel. Urinfraktionen sættes på søjlen, og der skylles med ca. 500 ml bufferopløsning. Derefter elueres i to timer med en vand-
5 methanolblanding med et stigende methanolindhold, idet der anvendes en gradient-blander. Til slut elueres med methanol. Flowet er her – ligesom i de følgende procedurer – 3,0 ml/min., med mindre andet er angivet.

De første 500 ml eluat opsamles i to portioner á 250 ml (fraktion 1 og 2). Derefter opsamles eluatet i fraktioner á 25 ml. Fra hver fraktion udtages en 50 µl prøve til
10 scintillationstælling. Resultaterne er afbildet i fig. 3. Det ses, at ikke alle de radioaktive stoffer bliver adsorberet på søjlen, idet fraktionerne 1–48, der opsamles under prøvepåsætningen og skylningen af søjlen, også indeholder radioaktive stoffer.

Urinen blev påsat indtil fraktion 30, hvorefter søjlen blev skyllet med bufferopløsning indtil fraktion 48. Ved fraktion 49 påbegyndtes elueringen med vand-methanolblan-
15 ding.

Halvdelen af de radioaktive stoffer elueres med methanol i fraktionerne 67–75, der viser en forholdsvis markant top i fig. 3. Fraktionerne 67–75 sammenhældes og inddampes til tørhed i en rotationsfordamper. Tørstoffet genopløses i 100 ml vand.

2. rensning:

20 Søjlen skylles indledningsvist med methanol og buffer som ved første rensning. Derefter påsættes opløsningen med tørstof fra fraktionerne 67–75 på søjlen med en hastighed på 1,0 ml/min. Søjlen skylles med ca. 400 ml bufferopløsning, og en gradienteluering gennemføres med en vand-methanolblanding med et methanolindhold stigende fra 0 til 100 % i løbet af 10 timer. Flowet er 2,5 ml/min. Til slut elueres med
25 methanol ved et flow på 2,5 ml/min. Når gradientelueringen startes, opsamles eluatet i fraktioner på 25 ml. Fraktionernes indhold af radioaktive stoffer undersøges med en

scintillationstæller. Det ses af resultaterne, der er afbildet i fig. 4, at der er sket en adskillelse, idet kurven har tre tydelige toppunkter. Disse toppunkter repræsenterer tre forskellige metabolitter eller grupper af metabolitter med forskellig polaritet, hvorved den mest polære findes længst til venstre i figuren.

- 5 Fraktionerne 33–42 hældes sammen og inddampes. Tørstoffet opløses i ca. 35 ml vand.

3. rensning:

Der foretages en yderligere oprensning ved hjælp af præparativ HPLC.

- 10 HPLC-metoden er isokratisk. Den mobile fase består af 3 % tetrahydrofuran og 0,01 M kaliumphosphatbuffer med pH 6,0. Der anvendes UV-detektion ved 280 nm. Den anvendte præparative kolonne har en længde på 250 mm og en indvendig diameter på 8 mm. Materialet er Spherisorb ODS-2 (fra Phase Separation, USA) med en partikelstørrelse på 5 μ m.
- 15 Den vandige opløsning af tørstoffet chromatograferes lidt ad gangen, idet der indsprøjtes 500 μ l pr. gang (loop-volumenet er 500 μ l). Hver chromatografering tager 40 minutter, da de upolære stoffer i blandingen er længe om at blive elueret med den meget polære, mobile fase. Fig. 5 viser et typisk chromatogram optaget ved 280 nm. Eluaterne ved toppen, der er mærket "8.425", opsamles og inddampes til nær tørhed
- 20 i en rotationsfordamper ved 30–40 °C. Tørstoffet, der benævnes metabolit MII, genopløses i 10 ml vand. Radioaktiviteten i 25 μ l måles ved væskescintillation til ca. 90.000 cpm.

4. rensning:

NMR-spektre af stoffet

Ved analyse af den vandige opløsning af MII med andre mobile faser end anvendt ved ovenstående oprensning, ses det, at stoffet ikke er helt rent. Det er nødvendigt med endnu en oprensning ved hjælp af præparativ HPLC.

- 5 Der vælges en mobil fase indeholdende 12 % acetonitril i 0,01 M kaliumphosphat-buffer med pH 6,0. Flowet er 4,0 ml/min. MII-opløsningen chromatograferes 500 µl ad gangen. Fig. 6 viser et chromatogram optaget ved 280 nm. Eluaterne ved toppen med en retentionstid på 8,5 minutter opsamles og inddampes til tørhed i en rotationsfordamper. Tørstoffet genopløses i 5 ml vand. Opløsningen analyseres med
- 10 to forskellige mobile faser for at undersøge, om stoffet er rent. Begge analyser viste kun én top. Metabolitten MII er isoleret.

Afsluttende rensning:

- Slutrensningen foretages for at fjerne buffersubstans og rester af det kiselgelbaserede kolonnemateriale, idet der udføres en fastfaseekstraktion. Der anvendes en XAD-2-
- 15 søjle (0,7 x 4 cm, partikelstørrelse på 0,3–1 mm). Rensningen følges ved HPLC-analyse af eluatet. Søjlen vaskes med 20 ml acetone, derefter med 20 ml methanol og til sidst med 50 ml vand. MII-opløsningen hældes derefter på søjlen. Det meste MII adsorberes på kolonnematerialet, mens den uorganiske buffersubstans passerer igennem søjlen. Søjlen vaskes to gange med 5 ml vand pr. gang. Metabolitten MII elueres ved
- 20 hjælp af 5 ml methanol. Søjlen vaskes to gange med 5 ml methanol pr. gang. De tre methanolfractioner hældes sammen og inddampes til tørhed i en rotationsfordamper.

Identifikation:

- En prøve af den isolerede metabolit MII opløses i D₂O. NMR-spektre optages og analyseres. Der foretages også en massespektrometrisk undersøgelse af metabolitten
- 25 MII. Konklusionen på analysen af NMR- og massespektrene er, at MII er 6-hydroxy-

skatol, idet NMR-spektrene viser, at stoffet er en 6-substitueret skatol, og massespektrene afslører, at stoffet er skatol, hvorpå er bundet et oxygenatom.

Eksempel 3

På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 2 isoleres og identificeres 3-methyl-3-hydroxy-oxindol som metabolit af skatol, ider der dog anvendes en ukasteret hangris med højt skatolindhold.

På samme måde findes yderligere metabolitter, f. eks. andre af de i fig. 1 og 2 viste metabolitter.

Eksempel 4

10 Dette eksempel omhandler bestemmelse af metabolit-koncentrationen i grise med normalt og forhøjet skatolindhold med henblik på at bekræfte, at nogle hangrise har en arveligt betinget defekt med hensyn til metabolisme af skatol og derfor er langsommere til at omsætte skatol end flertallet af hangrise.

15 Grisene udvælges på grundlag af deres naturlige skatolindhold i blod. Fire af hangrisene har et "højt" skatolindhold i blodet, mens de resterende tre hangrise har et "normalt" skatolniveau i blodet. Til sammenligning undersøges også fire søer.

Skatol mærket med ^{14}C injiceres intravenøst i dyrene i en dosis på 5 mg/kg. Blodprøver udtages på forskellige tidspunkter i 24 timer efter injektionen. Desuden opsamles urinen.

20 Blodprøverne analyseres for skatol og metabolitterne MI, MII, MII og MIV ved HPLC-analyse, jvf. Jens Hansen-Møller: "Determination of indolic compounds in pig back fat by solid phase extraction and gradient high-performance liquid chromatography with special emphasis on the boar taint compound skatole, Journal of

Chromatography, 624 (1992) 479-490. Der anvendes dog en 15 cm søjle, hvis matrix har en kornstørrelse på 5 μm . Skatol bestemmes ved fluorescensdetektion, mens metabolitterne bestemmes ved scintillationsdetektion. På grundlag af koncentrationen i prøverne og tidsintervallet for opsamlingen beregnes AUC-værdierne (AUC = Area Under Curve).

Resultater:

AUC-værdier i mmol.h/ml for skatol og dens metabolitter i plasma:

	Gris	Nr.	Skatol	MI	MII	MIII	MIV
10	Hangris (N)	1	33	8	94	110	23
	Hangris (N)	2	39	13	137	95	15
	Hangris (N)	3	19	10	79	61	10
	Hangris (H)	4	44	65	9	214	18
	Hangris (H)	5	52	77	4	228	46
15	Hangris (H)	6	48	52	1	258	48
	Hangris (H)	7	40	40	0	185	37
	So	8	43	7	135	94	63
	So	9	29	25	194	40	28
	So	10	28	13	115	67	34
20	So	11	21	13	147	125	23

Bem.: (N) = normalt skatolindhold; (H) = forhøjet skatolindhold ("lugtende" hangrise)

Det ses af tabellen, at hangrise med et normalt skatolindhold har en AUC-værdi for metabolitten MII (6-hydroxy-skatol) i blodet på så meget som 79-137 mmol.h/ml, mens de "lugtende" hangrise har en AUC-værdi for MII på kun 0-9 mmol.h/ml. Der er altså en markant forskel i AUC-værdierne for MII mellem normale og "lugtende" hangrise, hvilket skyldes en arveligt betinget defekt hos de lugtende grise, så de kun

langsomt omsætter skatol. På grund af den arveligt betingede, store forskel i MII-indholdet er det forholdsvis let at adskille de to typer grise fra hinanden, i modsætning til ved den hidtil anvendte metode, hvor en mere usikker grænse for et tilladeligt skatolindhold anvendes til at adskille de to kategorier af grise.

- 5 Det ses desuden af tabellen, at de lugtende dyr har en delvis kompenserende metabolisme for den nævnte arvelige defekt, idet AUC-værdien for MI og MIII er betydeligt større end for normale hangrise (henholdsvis ca. 5 gange og 3 gange så meget MI og MIII som i normale grise). Kompensationen er dog kun delvis, idet undersøgelser har vist, at "body clearance" og udskillelsen af skatol i urinen er mindre
- 10 end hos normale hangrise.

Eksempel 5

På tilsvarende måde som i eksempel 4 foretages der en undersøgelse af skatolmetabolismen i forskellige grise, idet indholdet af metabolitter bestemmes i leverprøver.

Resultater:

- 15 De lugtende grise har et forhøjet indhold af MI. Derudover findes mindst to yderligere metabolitter Mx og My, der hos lugtende grise forekommer i større mængder i leveren end hos normale grise.

Eksempel 6

- 20 Fra normale og defekte grise isoleres mikrosomalfraktioner. De inkuberes derefter med skatol (50 μ M), og dannelsen af skatols forskellige metabolitter, specielt 6-hydroxyskatol, undersøges ved tilstedeværelse eller fravær af mulige inhibitorer.

De mikrosomale proteiner opslæmmes i en 0,1 M fosfatbuffer tilsat 0,2 mM HADPH og et NADPH-genererende system. Der anvendes en inkubationstid på 15-60

minutter ved 37°C. Reaktionen startes ved tilsætning af de mikrosomale proteiner og stoppes ved tilsætning af trifluoreddikesyre og afkøling på is. Som mulige inhibitorer anvendes acetanilid (100 µM), cyclosporin A (10 µM), phenacetin (10 og 100 µM), quinidin (0,1, 1 eller 10 µM) mephenytoin (80 µM), chlorzoxazon (80 µM) eller
5 triacetyloleandomycin (10 eller 100 µM). Reaktionen følges ved HPLC-analyse af reaktionsblandingen.

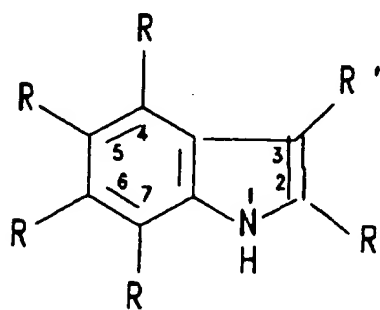
O-demethyleringen af dextromethorphan undersøges ligeledes med og uden tilstedeværelse af skatol.

- 10 Resultaterne viser, at quinidin kraftigt inhiberer dannelsen af 6-hydroxyskatol, hvorimod inhibitorer til andre isoenzymer som CYP2E (chlorzoxazon), CYP2C (mephenytoin) og CYP1A (acetanilid og phenacetin) kun havde ringe effekt.

hvor grupperne R afhænger af indholdet af H₂O

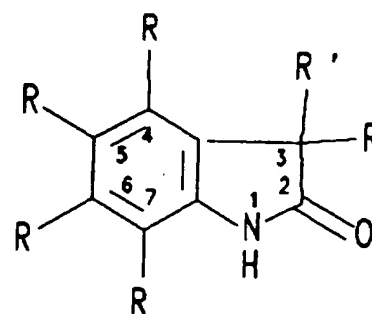
Patentkrav

1. Fremgangsmåde til at undersøge grise for at bestemme om de er egnede til avl eller formering, ved hvilken fremgangsmåde en prøve fra et dyr analyseres, og dyret på grundlag af analysens resultat henføres til en kategori af egnede dyr eller en kategori af uegnede dyr, kendetegnet ved, at grisene undersøges for en arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af dyrets kød- eller fedtvæv, hvorved bestemmes på iøvrigt kendt måde tilstedeværelse eller fravær i prøven af
 - en metabolit af stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt af dyrets kød- eller fedtvæv,
 - et naturligt enzym, der kan metabolisere stoffet, der er ansvarligt for den ubehagelige lugt, eller
 - en DNA-sekvens, som koder for produktionen af pågældende enzym.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at prøven undersøges for en metabolit af indol eller skatol.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at prøven analyseres for en metabolit valgt blandt forbindelserne med formlerne



Ia

og

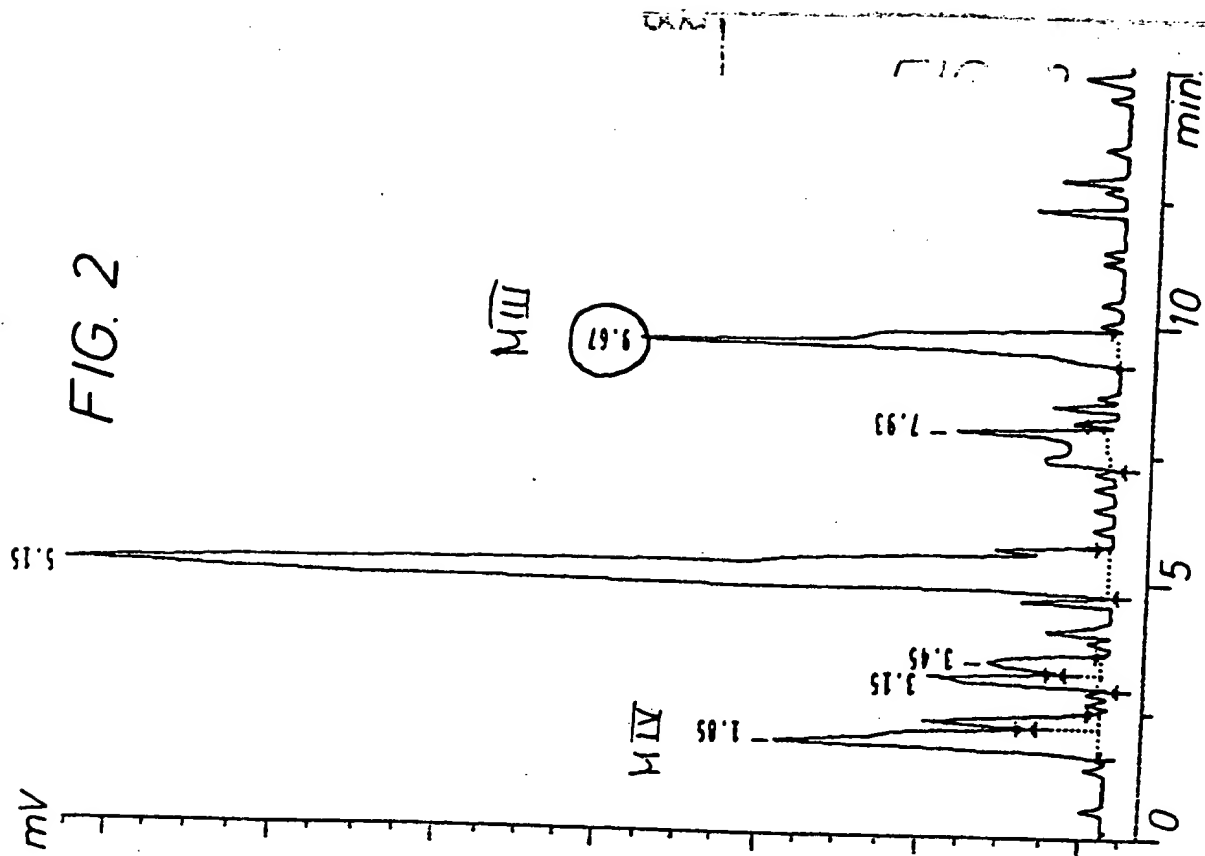
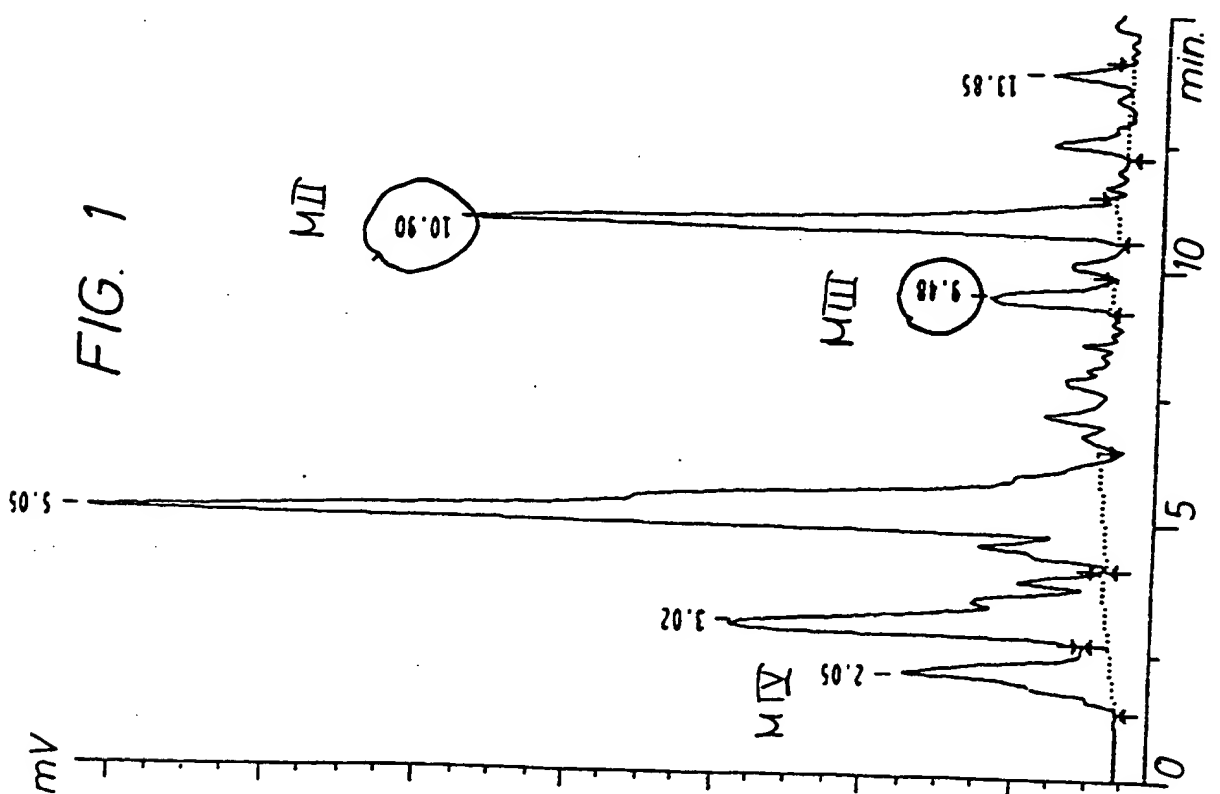


Ib

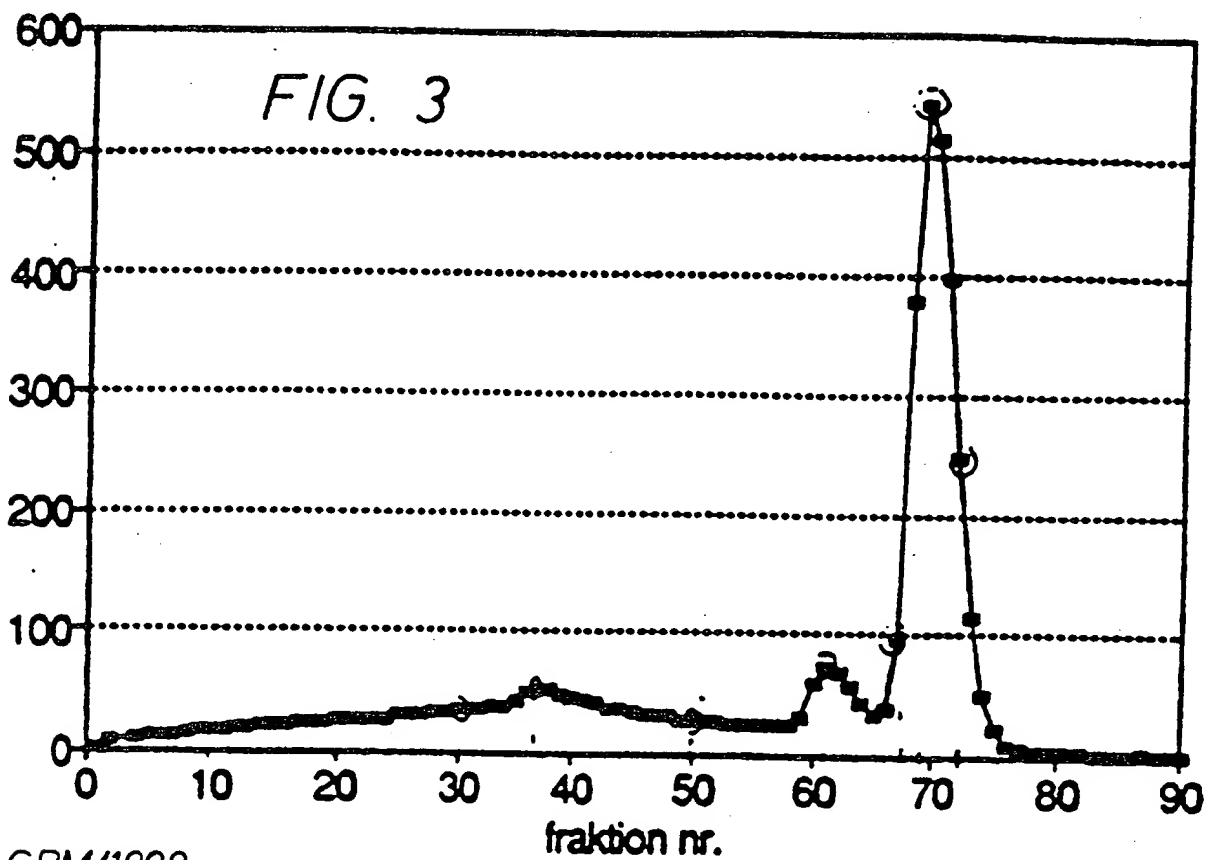
hvor i grupperne R uafhængigt af hinanden er H eller OH, og gruppen R' betyder CH_3 , CH_2 , OH, CHO eller COOH , idet mindst én af grupperne R er OH, når R' betyder CH_3 , og deres ethere med glucuronsyre, sulfatestere, N-oxider og N-glucuronider.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, kendetegnet ved, at prøven analyseres for en
5 forbindelse med formelen Ia eller Ib med en 4-, 5-, 6- eller 7-stillet OH-gruppe.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, kendetegnet ved, at prøven analyseres for 6-hydroxyskatol.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at dyrene, i hvilke den søgte
metabolit findes i en mængde, der ligger 2 gange, især 3 gange under gennemsnittet
10 hos en tilfældigt sammensat, større population af grise, kategoriseres som dyr med arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at prøven analyseres for en
metabolit af en kompensationsmetabolisme til den normale metabolisme af stoffet, der
er ansvarligt for den ubehagelige lugt, og at dyrene, i hvilke den søgte metabolit findes
15 i en mængde, der ligger 2 gange, især 3 gange over gennemsnittet hos en tilfældigt sammensat, større population af grise, kategoriseres som dyr med arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at prøven analyseres for flere
metabolitter, og at analyseresultaterne indsættes i en algoritme for undersøgelse af
20 tilstedeværelse eller fravær af arvelig defekt.
9. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1-8, kendetegnet ved, at der i grisene inden
udtagningen af prøven injiceres en dosis af stoffet, der er ansvarligt for den
ubehagelige lugt.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, kendetegnet ved, at stoffet er mærket, fortrinsvis med ^{14}C , ^{13}C , ^3H eller ^2H , eller foreligger i form af en ikke naturligt i grise forekommende skatolanalogue, fortrinsvis tropisetron eller ondansetron.
11. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at prøven analyseres for et P_{450} -isoenzymsystem eller en DNA-sekvens, som koder for produktionen af dette isoenzym.
12. Fremgangsmåde ifølge krav 11, kendetegnet ved, at prøven analyseres for enzymet $\text{P}_{450}\text{IID6}$ eller en DNA-sekvens, som koder for produktionen af dette enzym.
13. Fremgangsmåde ifølge et af kravene 1–12, kendetegnet ved, at prøven er urin, plasma, spyt eller lever-, kød- eller fedtvæv, eller deres koncentreter eller ekstrakter.
14. Anvendelse af mindst ét forælderdyr, som er fundet fri for arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af dets kød- eller fedtvæv ved fremgangsmåden ifølge krav 1, eller som nedstammer fra et eller flere sådanne dyr, ved avl eller formering af grise.
15. Anvendelse af sæd fra omer, som er fundet fri for arvelig defekt med hensyn til ubehagelig lugt af deres kød- eller fedtvæv ved fremgangsmåden ifølge krav 1, eller omer, som nedstammer fra et eller flere sådanne dyr, til inseminering af søer.



CPM/1000



CPM/1000

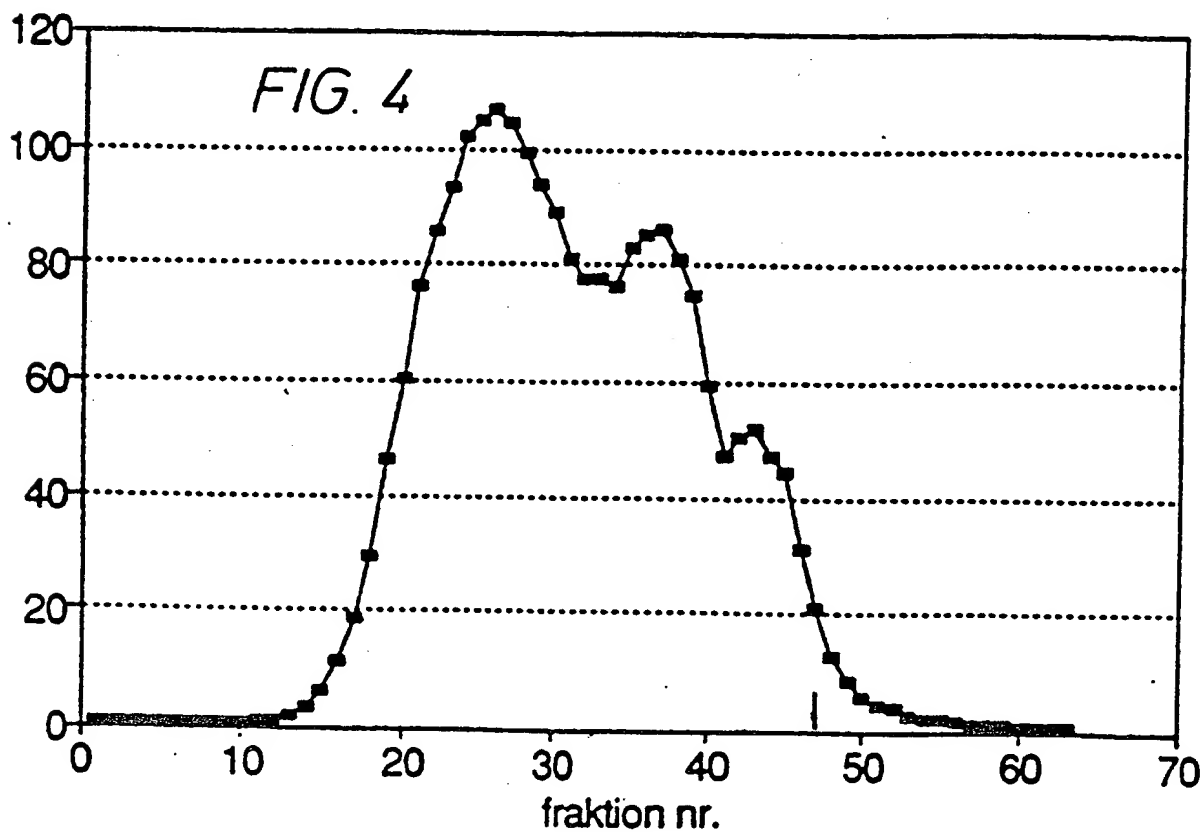


FIG. 5

